DOI:10.11931/guihaia.gxzw202303007

珠子参叶皂苷对脂肪酶抑制机制及降血脂研究

郑花婵[1,2]，孟令儒[1,2]，何苗[1,2]，黄文丽[1,2]，但林蔚[1,2]，徐虹[1,2]，邓翀[1,2]，
张化为[1,2]，姜祎[1,2*]，宋小妹[1,2]
(1. 陕西中医药大学 药学院，陕西 咸阳 712046； 2. 陕西中医药大学陕西省中药基础与新药研究重点实验室，陕西 咸阳 712046)

摘要：珠子参叶是五加科植物珠子参（*Panax japonicas* var. *major*）的干燥带梗叶，为秦巴地区特色中药材。为合理开发利用珠子参叶并阐明其化学物质基础，该研究利用 HPLC 方法分析珠子参叶皂苷部位的主要化学成分，测定珠子参叶皂苷部位的脂肪酶抑制活性及抑制类型，通过分子对接及动物实验验证脂肪酶抑制机制及降血脂作用。结果表明：（1）珠子参叶皂苷部位主要成分为 20(*S*)-人参皂苷 Rg_2、20(*R*)-人参皂苷 Rg_2、人参皂苷 Rb_2、人参皂苷 Rb_3、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rh_2。（2）珠子参叶皂苷部位、20(*R*)-人参皂苷 Rg_2 对脂肪酶具有较强的抑制作用，其 IC_{50} 分别为 0.14 和 2.30 μmol·L^{-1}。（3）珠子参叶皂苷部位、20(*R*)-人参皂苷 Rg_2、人参皂苷 Rb_3 对脂肪酶的抑制为可逆性抑制，抑制类型为非竞争型抑制。（4）配体与 ARG337B、ASP331B、ILE248B 残基结合可能有助于提高配体的脂肪酶抑制活性。（5）珠子参叶总皂苷可以显著降低高脂血症小鼠血清中胆固醇和甘油三脂的含量。该研究为珠子参叶在降血脂方面的深入开发利用奠定基础。

关键词：珠子参叶，皂苷，脂肪酶，酶动力学，分子对接，体内验证
中图分类号：R932　文献标识码：A　文章编号：

Inhibition mechanism and hypolipidemic effect on lipase of saponins fraction from *Panax japonicas* leaves

ZHENG Huachan[1,2], MENG Lingru[1,2], HE Miao[1,2], HUANG Wenli[1,2], DAN Linwei[1,2], XU Hong[1,2], DENG Chong[1,2], ZHANG Huawei[1,2], JIANG Yi[1,2*], SONG Xiaomei[1,2]
(1. *School of Pharmacy*, *Shaanxi University of Chinese Medicine*, Xianyang 712046, Shaanxi, China; 2. *Shaanxi Provincial Key Laboratory of Basic and New Drug Research in Traditional Chinese Medicine*, *Shaanxi University of Chinese Medicine*, Xianyang 712046, Shaanxi, China)

Abstract: The aerial part of *Panax japonicus* was called “Zhuzishen Ye”, it is a characteristic Chinese herbal medicine in Qinba area. In order to rationally utilize “Zhuzishen Ye” and clarify its chemical constituents, the main chemical constituents of the saponins fraction from “Zhuzishen Ye” were analyzed with HPLC, the inhibitory activity and inhibition type of the saponins fraction of “Zhuzishen Ye” on lipase were determined, and the lipase inhibition mechanism and hypolipidemic effect were verified with molecular docking and animal experiments. The results were as follows: (1) The chemical constituents of saponins fraction from “Zhuzishen Ye” were

---

基金项目：陕西省科技厅项目(2018ZDXM-SF-007)；陕西中医药大学创新团队项目(2019-YL12)；陕西中医药大学质量提升工程项目（ZG031）。

第一作者：郑花婵（1998-），硕士研究生，研究方向为中草药药效物质基础，(E-mail) zhenghuachan678@163.com。

[*]**通信作者**：姜祎，教授，研究方向为中草药药效物质基础，(E-mail) 966812@qq.com。

20(*S*)-Ginsenoside Rg$_2$, 20(*R*)-Ginsenoside Rg$_2$, Ginsenoside Rb$_2$, Ginsenoside Rb$_3$, Ginsenoside Rd and Ginsenoside Rh$_2$. (2) The saponins fraction of "Zhuzishen Ye" and 20(*R*)-Ginsenoside Rg$_2$ had strong inhibitory effect on lipase with IC_{50} of 0.14 and 2.30 $\mu mol \cdot L^{-1}$ respectively. (3) The saponins fraction of Zhuzishen Ye, 20(*R*)-Ginsenoside Rg$_2$ and Ginsenoside Rb$_3$ were all reversible inhibition, and the inhibition type was non-competitive inhibition. (4) The binding of ligands to ARG337B, ASP331B and ILE248B residues may help to improve the lipase inhibitory activity of ligands. (5) Saponins of "Zhuzishen Ye" could significantly reduce the content of cholesterol and triglyceride in serum of hyperlipidemia mice. This study laid a foundation for the further development and utilization of "Zhuzishen Ye".

Key words: *Panax japonicas* leaves, saponin, pancreatic lipase, enzyme kinetics, molecular docking, verification *in vivo*

珠子参叶是五加科植物珠子参（*Panax japonicus* var. *major*）的干燥带梗叶，性微寒，苦，甘；归肝、肺、胃经，具有清肺止咳、生津、润喉、防暑、滋补强壮的功效，在民间多泡茶饮用 (宋小妹，2011; 国家药典委员会，2020)。珠子参叶的应用历史可追溯到清朝，由于当时人参和人参叶价格日渐昂贵，珠子参叶作为人参和人参叶的替代品开始使用 (赵学敏，1963;陆维承，2016)。

脂肪酶是水解膳食中脂质的关键酶(Jaeger & Reetz,1998; 廖家乐，2022)，参与脂肪消化、吸收、利用的全过程(王哲等，2013)；抑制其活性能有效减少脂质的消化吸收，从而降低血脂水平，抑制脂肪酶的活性是治疗高脂血症、肥胖、非酒精性脂肪肝等疾病的有效策略(de la Garza et al., 2011; Yun et al., 2007)。三萜皂苷类化合物具有脂肪酶抑制作用，是潜在的有效的治疗肥胖及其相关疾病的化合物 (Han et al ., 2005; oshizumi et al., 2006; Ercan & El, 2016; Liu et al., 2017; 冯海燕，2019；邱悦，2020; Navarro Del Hierro et al., 2020)。

珠子参作为常用中药材，生长缓慢成药周期长，目前野生珠子参已处于濒危状态，而珠子参叶作为非药用部位被遗弃，造成资源浪费，前期课题组研究发现：珠子参叶的主要化学成分是三萜类化合物，包括：20(22)*E*,24-达玛二烯-3β,6α,12β-三醇、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rb$_1$、人参皂苷 Rb$_2$、人参皂苷 Rb$_3$ 和人参皂苷 Rc、人参皂苷 Rs$_2$、西洋参皂苷 R$_1$、人参皂苷 Rs$_1$、三七皂苷 Fe、人参皂苷 Rd$_2$、Gypenosiden IX，20(21),24-达玛二烯-3β,6α,12β-三醇，20(22)*Z*,24-达玛二烯-3β,6α,12β-三醇，珠子参苷 Z 等，还有 5, 7-二羟基-8-甲氧基黄酮 (赵东东等，2013；何瑞等，2014；杨延等，2019；张化为等，2020)，因此，探究珠子参叶的化学物质基础和生物活性，对提高珠子参全植株的利用率具有重要意义。目前为止，珠子参叶皂苷的脂肪酶抑制机制及降血脂作用尚未见报道。本研究以珠子参叶为研究对象，依托完善的天然产物开发研究平台，综合利用现代色谱分离手段和现代药理学方法，拟探讨以下问题：（1）珠子参叶皂苷部位主要成分是哪些？（2）珠子参叶皂苷部位对脂肪酶是否具有抑制作用？（3）珠子参叶皂苷部位对脂肪酶抑制类型是那种？（4）珠子参叶皂苷部位成分与那种残基结合可提高脂肪酶抑制活性？（5）珠子参叶皂苷部位是否可以降脂？

1 仪器与材料

1.1 主要实验仪器和药品

分析电子天平（EX125ZH 型，奥豪斯仪器（常州）有限公司）；多功能酶标仪（Synergy TM H1 型，美国 Bio Tek）；高效液相色谱仪（Waters e2695 型，美国 Waters 公司）；奥利司他胶囊（批号：190204，重庆华森制药有限公司）；移液器（Research Plus 系列，德国 Eppendorf）；低速台式离心机（TDL-50B 型，上海安亭科学仪器厂）；高速台式离心机（TG16-WS 型，

湘仪离心机仪器有限公司）；皱褶假丝酵母脂肪酶（批号：S25740）、4-硝基苯基棕榈酸酯（4-nitrophenyl palmitate，4-NPP，批号：EC250112）、柠檬酸钠（批号：75164），以上试剂均购自美国 Sigma 公司；色谱乙腈（AH015 型，Honeywell）；DMSO（批号：D6370）购自北京博奥拓达科技有限公司； D101 型大孔树脂购自天津南开大学化工厂；20(*S*)-人参皂苷 Rg_2（货号：B21058）、20(*R*)-人参皂苷 Rg_2（货号：B21727）、人参皂苷 Rb_2（货号：B21051）、人参皂苷 Rb_3（货号：B21052）、人参皂苷 Rd（货号：B21054）均购自上海源叶生物科技有限公司；人参皂苷 Rh_2（货号：111748）购自中国药品生物制品鉴定所；50mM Tris-HCl（pH:7.8）(批号：BB0512)购自陕西中晖赫彩生物医药科技有限公司。

1.2 实验动物

SPF 级 SD 小鼠，共 60 只，体重为 18 ~22 g，购自成都达硕实验动物有限公司，实验动物生产许可证号为：SCXK(川)2020-030，适应性饲养 5 d。

2 实验方法

2.1HPLC 法分析化学成分

2.1.1 色谱条件

色谱柱：Agela Technologies lnnoval ODS-2 (4.6mm×250 mm, 5 μm)；流动相：水溶液（A）-乙腈溶液（B），梯度洗脱：0~10 min，10%→28%B; 10~27 min，28%→28%B; 27~33 min，28%→31%B；33~46 min，31%→31%B；46~50 min，31%→36%B；50~55 min，36%→39%B；55~70 min，39%→60%B；柱温 30 ℃；进样量 10 μL，检测波长 203 nm；流速：1.0 $mL\cdot min^{-1}$。

2.1.2 供试品溶液的制备

本实验所用药材由陕西中医药大学王继涛高级实验师鉴定为五加科人参属珠子参 *Panax japonicus* var. *major* 的干燥叶。参照文献方法(赵东东等，2013) 提取珠子参干燥叶。取干燥的 70%乙醇洗脱部位粉末约 0.05 g，置 50 mL 具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 50 mL，称定重量，超声提取 10 min，放冷，再称定重量，用甲醇补足损失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，得到所需浓度的溶液。

2.1.3 对照品溶液的配制

精密称取对照品 20(*S*)-人参皂苷 Rg_2、20(*R*)-人参皂苷 Rg_2、人参皂苷 Rb_2、人参皂苷 Rb_3、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rh_2，用甲醇分别制成浓度为 0.10、0.25、0.10、0.25、0.11、0.50 $mg\cdot mL^{-1}$ 的溶液。

2.2 脂肪酶抑制实验及动力学机制研究

2.2.1 不同皂苷对脂肪酶活性的影响

脂肪酶抑制活性测定参考报道的方法 (Liu et al., 2018；王亚丽等，2020；黄桂等，2021) 稍加修改，脂肪酶 Tris-HCl 溶液浓度为 280 $U\cdot mL^{-1}$。4-NPP 的 DMSO 溶液浓度 750 $\mu mol\cdot mL^{-1}$，奥利司他的浓度为 250 $\mu mol\cdot mL^{-1}$，珠子参叶皂苷部位以 DMSO 为溶剂配制成浓度为 2.52 $mg\cdot mL^{-1}$ 的溶液，20(*S*)-人参皂苷 Rg_2、20(*R*)-人参皂苷 Rg_2、人参皂苷 Rb_2、人参皂苷 Rb_3、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rh_2 以 DMSO 为溶剂配制成 500 $\mu mol\cdot mL^{-1}$ 的溶液，使用时稀释成不同浓度，用于后续实验。

将 25 μL 珠子参叶皂苷部位（珠子参叶皂苷部位摩尔质量按奥利司他摩尔质量算，终浓度为 0、0.625、6.25、62.5、125 $\mu mol\cdot mL^{-1}$）、人参皂苷 Rb_3（终浓度为 0、5、12.5、125、250 $\mu mol\cdot mL^{-1}$）、20(*S*)-人参皂苷 Rg_2（终浓度为 0、1、2.5、5、12.5 $\mu mol\cdot mL^{-1}$）、20(*R*)-人参皂苷 Rg_2（终浓度为 0、25、50、125、250 $\mu mol\cdot mL^{-1}$）、人参皂苷 Rb_2、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rh_2（终浓度为 0、12.5、25、125、250 $\mu mol\cdot mL^{-1}$）和 45 μL 胰脂肪酶于 96 孔板中 37 ℃孵育 30 分钟，再加入 90 μL 的 4-NPP（终浓度为 750 $\mu mol\cdot mL^{-1}$）37 ℃恒温反应 20 min，加入柠檬酸钠终止反应，405 nm 下测定吸光度。

按照如下公式计算胰脂肪酶活性，即：

胰脂肪酶活力=（$A_{样品}$-$A_{样品对照}$）/（$A_{空白}$-$A_{空白对照}$）×100%

$A_{样品}$：加入样品和活性酶反应后的吸光度；$A_{样品对照}$：加入样品和失活酶反应后的吸光度；$A_{空白}$：加入活性酶和 DMSO 反应后的吸光度；$A_{空白对照}$：加入失活酶和 DMSO 反应后的吸光度。所有反应中均有 4-NPP。

2.2.2 不同皂苷对脂肪酶活性的抑制机理

按照“2.2.1”项下的珠子参叶皂苷部位、人参皂苷 Rb_3、20(*S*)-人参皂苷 Rg_2 样品浓度和 4-NPP 底物浓度，参照文献方法稍加修改 (陈静等，2021)，通过改变脂肪酶浓度（终浓度为 0、70、140、280、560 U·mL^{-1}）测定不同浓度样品在不同浓度脂肪酶催化下水解 4-NPP 底物产生的吸光度。将 25 µL 不同样品及浓度的皂苷和 45 µL 胰脂肪酶于 96 孔板中 37 ℃孵育 30 min，在加入 90 µL 4-NPP（终浓度为 750 µmol·mL^{-1}），405 nm 下测定吸光度。按下式计算相对酶活力：

相对酶活力=$(A_2-A_1)/(A_4-A_3)$ ×100%

式中 A_1 和 A_2 是不同皂苷、脂肪酶与 4-NPP 反应初末的吸光度；A_3 和 A_4 是脂肪酶与 4-NPP 反应初末的吸光度。

2.2.3 不同皂苷对脂肪酶活性的抑制类型和抑制常数

按照“2.2.2"项下的测定方法，固定脂肪酶的浓度，改变 4-NPP(终浓度为 0.375、0.75、1.5、3 mmol·mL^{-1})，测定不同浓度皂苷对脂肪酶催化水解 4-NPP 后产生的吸光度。

2.3 分子对接数据库及软件

所用软件包括：ChemBioDraw3D、AutoDockTools1.5.6、PyMOL、CADD1.5.6、Vision1.5.6。从 PubChem 数据库中下载相关化合物的 2D 结构文件，靶蛋白的晶体结构从 PDB 数据库中获取，利用 PyMOL 软件对靶蛋白进行去除水分子、加氢等前处理，使用软件 AutoDock Tools1.5.6 对化合物和靶蛋白进行分子对接。靶蛋白及其结合位点为 ILPB 蛋白的 A-BOG 位点。

2.4 动物实验

2.4.1 药物的制备及给药

实验前将小鼠随机分为 6 组：空白组（10 只）、高脂血模型组（10 只）、奥利司他组（10 只）、皂苷部位高中低剂量组（各 10 只）。其中空白组饲喂基础饲料，其他组饲喂高脂饲料，建立高脂血症模型。

高脂饲料配方如下：15%猪油、5%蛋黄、20%糖、0.5%盐、0.5%香油。

给予小鼠高脂饲料 35 天后开始给药，空白组及高脂血模型组给予一定剂量的生理盐水，奥利司他组按照 46.8 mg·kg^{-1} 灌胃给药，各给药组剂量按人每日服用量和提取物收率计算，高剂量组按照 117.0 mg·kg^{-1} 给予小鼠珠子参叶皂苷部位提取物（相当于 70 kg 的成人每日服用 20 g 提取物），中剂量组按照 58.5 mg·kg^{-1} 给予小鼠珠子参叶皂苷部位提取物，低剂量组按照 29.3 mg·kg^{-1} 给予小鼠珠子参叶皂苷部位提取物，每日给药一次，连续灌胃 3 周，于末次给药后称量体重。空白组、高脂血模型组小鼠给药期间分别继续饲喂基础饲料及高脂饲料，期间受试小鼠均正常摄食摄水。

2.4.2 样本采集及处理

末次给药后，所有小鼠禁食不禁水，16 h 后眼球取血，全血静置，于 4 ℃下保存，再以 3000 r/min 的转速离心 15 min，分离血清，按组依次分装，于-80 ℃冰箱中保存，备用。

2.4.3 生化指标的测定

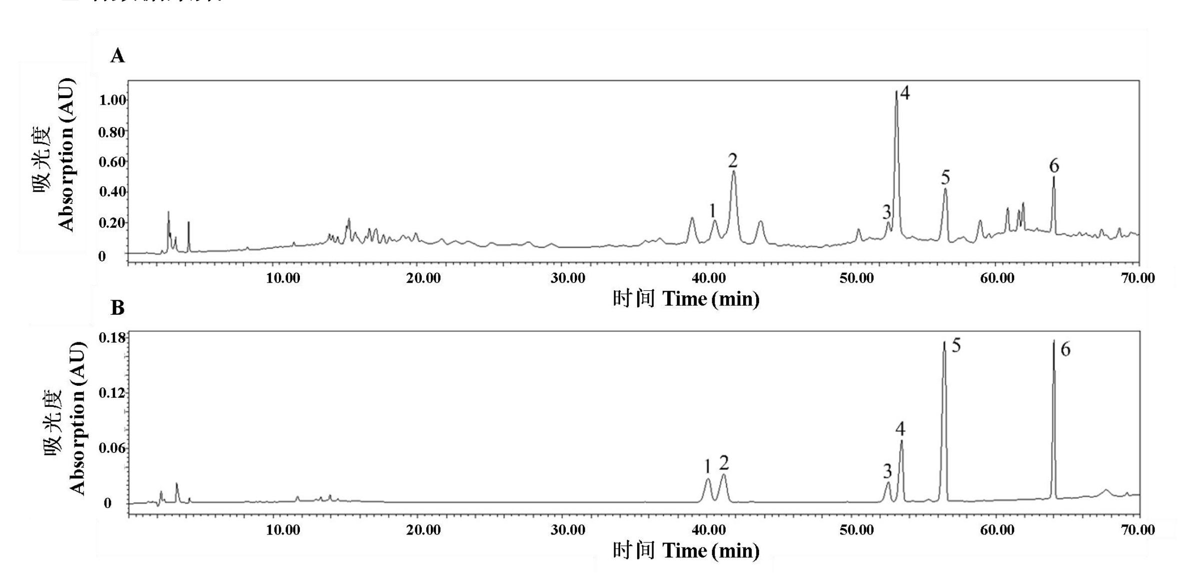
血清总胆固醇（total cholesterol，TC）和甘油三脂（triglyceride，TG）的含量分别按照试剂盒的说明书进行测定。

2.5 统计学处理

所有的统计分析均使用 Graphpad Prism 8.0.1 软件，计量数据以“均数±标准差”（$\bar{x}\pm s$）表示，两组比较用 *t* 检验，多组之间两两比较采用单因素方差分析。

3 结果与分析

3.1 色谱数据采集



注：1. 20(*S*)-人参皂苷 Rg_2；2. 20(*R*)-人参皂苷 Rg_2；3. 人参皂苷 Rb_2；4. 人参皂苷 Rb_3；5. 人参皂苷 Rd；6. 人参皂苷 Rh_2。

Note:**1**. 20 (*S*) -Ginsenoside Rg_2; **2**. 20 (*R*) -Ginsenoside Rg_2; **3**. Ginsenoside Rb_2; **4**. Ginsenoside Rb_3; **5**. Ginsenoside Rd; **6**. Ginsenoside Rh_2.

图 1 珠子参叶皂苷部位（A）与混合对照品溶液（B）的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of saponins fraction from *Panax japonicas* leaves (**A**) and Mixed reference substances solution (**B**)

由图 1 可知，珠子参叶皂苷部位的主要成分为 20(*S*)-人参皂苷 Rg_2、20(*R*) -人参皂苷 Rg_2、人参皂苷 Rb_2、人参皂苷 Rb_3、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rh_2。

3.2 脂肪酶活性测定结果

以“2.2.1”所述方法测定各皂苷的脂肪酶抑制活性，测试结果见表 3。由表 3 和图 3 可知珠子参叶皂苷部位、人参皂苷 Rb_2、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rh_2、20(*S*)-人参皂苷 Rg_2、20(*R*)-人参皂苷 Rg_2、人参皂苷 Rb_3 的 IC_{50} 分别为 0.14、28.00、31.00、18.00、8.73、2.30、60.76 μmol·L^{-1}。由图 2 可见，珠子参叶皂苷部位、20(*R*)-人参皂苷 Rg_2、人参皂苷 Rb_3 反应体系吸光度随时间的延长而逐渐增大，吸光度随时间变化的曲线通过原点，不存在迟滞效应。在相同反应时间下，随着珠子参叶皂苷部位、20(*R*)-人参皂苷 Rg_2、人参皂苷 Rb_3 样品浓度的增大，曲线的斜率不断减小，即脂肪酶酶催化水解 4-NPP 的速度不断降低，说明其具有抑制脂肪酶酶活性的作用。由图 2 可知，在反应 0~7.5 min 时 $A_{405\ nm}$ -Time 曲线近似呈线性关系，随着时间的延长，曲线逐渐平坦，斜率降低，反应的速度也就降低，此时测得的酶活力不能代表真实的酶活力，故取反应 7.5 min 时的反应速度为初速度。

表 3 皂苷和奥利司他的脂肪酶半数抑制浓度

Table 3 The half inhibitory concentration on lipase of saponins and orlistat

化合物 Compound	半数抑制浓度 IC_{50}（μmol·L^{-1}） Half inhibitory concentration IC_{50}
奥利司他	3.84（1 904.60 μg·L^{-1}）

Orlistat	
珠子参叶皂苷部位 Saponins fraction of *Panax japonicus* leaves	69.40 μg·L^{-1}(相当于奥利司他 0.14 μmol·L^{-1})
人参皂苷 Rb_2 Ginsenoside Rb_2	28.00
人参皂苷 Rd Ginsenoside Rd	31.00
人参皂苷 Rh_2 Ginsenoside Rb_2	18.00
20(*S*)-人参皂苷 Rg_2 20(*S*)-Ginsenoside Rg_2	8.73
20(*R*)-人参皂苷 Rg_2 20(*R*)-Ginsenoside Rg_2	2.30
人参皂苷 Rb_3 Ginsenoside Rb_3	60.76

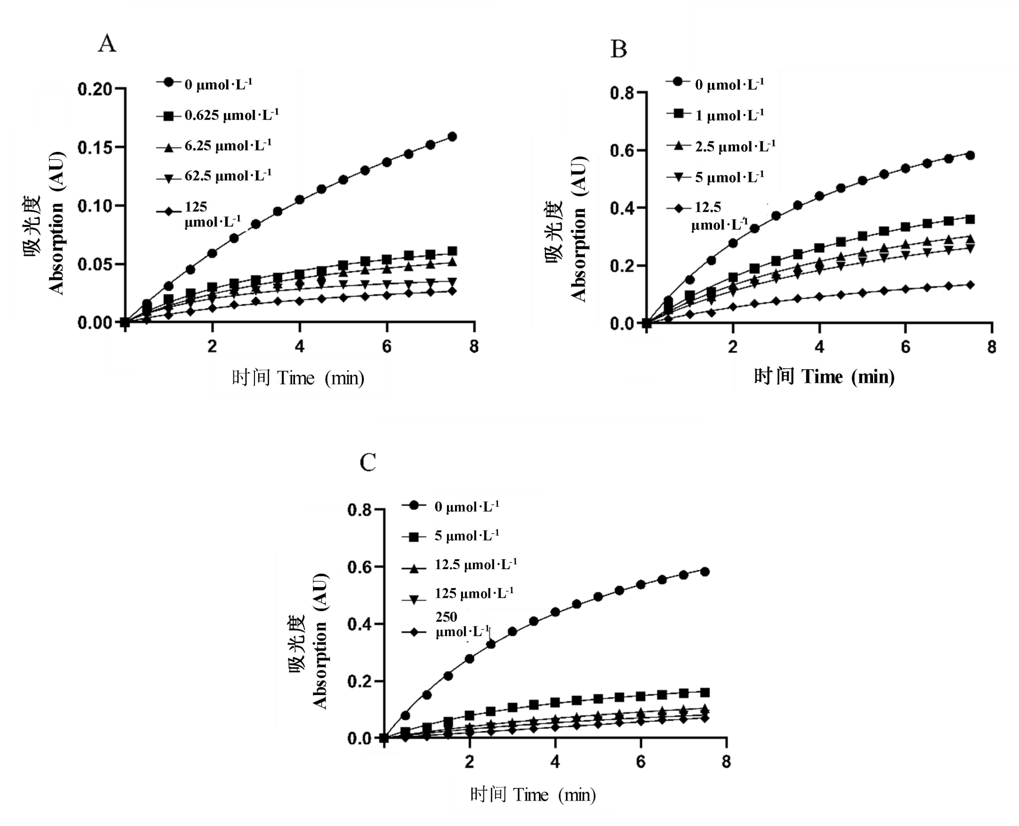


图 2 珠子参叶皂苷部位（A）、20(*R*)-人参皂苷 Rg_2（B）及人参皂苷 Rb_3（C）对脂肪酶的抑制作用曲线

Fig. 2 Effect curves of saponins fraction from *Panax japonicas* leaves (**A**), 20(*R*)-Ginsenoside Rg_2(**B**) and Ginsenoside Rb_3 on lipase(**C**)

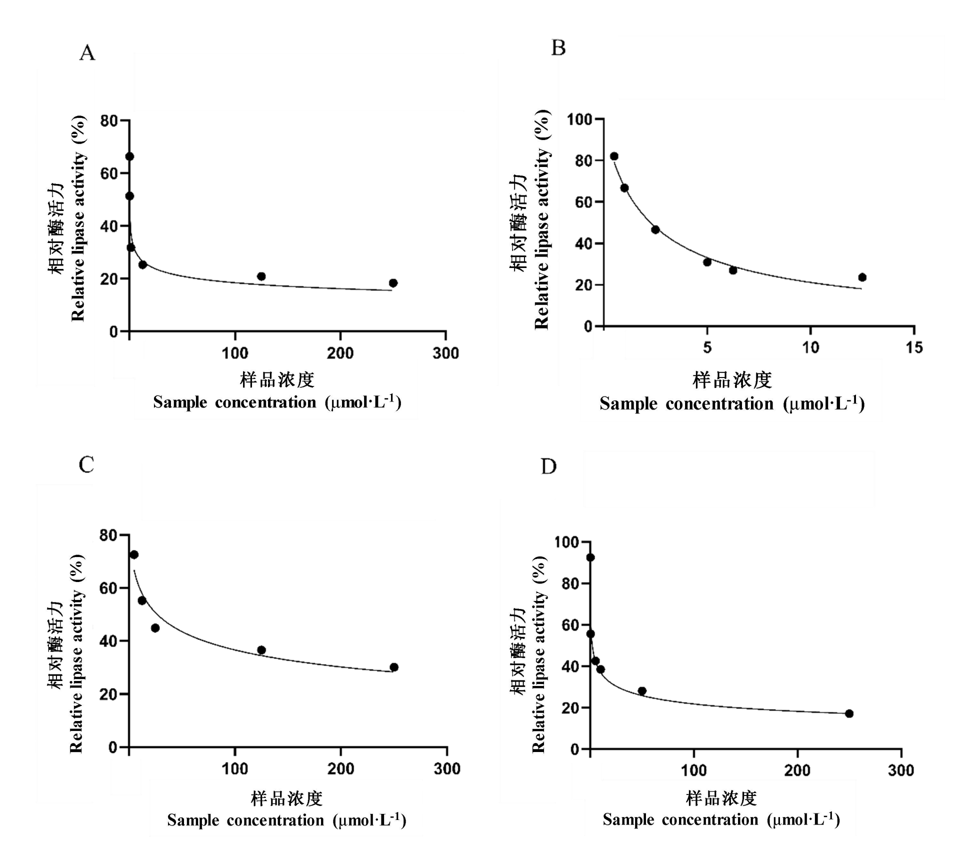


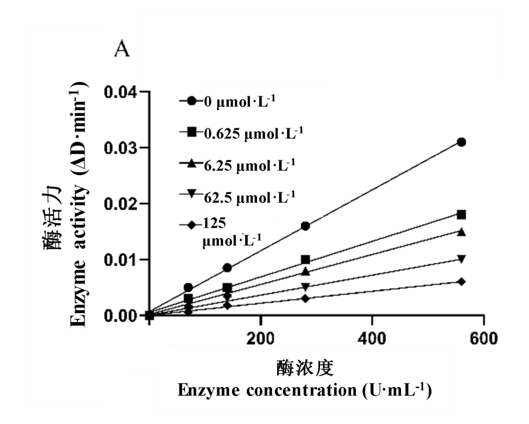
图 3 珠子参叶皂苷部位（A）、20(*R*)-人参皂苷 Rg$_2$（B）、人参皂苷 Rb$_3$（C）及奥利司他（D）对脂肪酶活力的影响

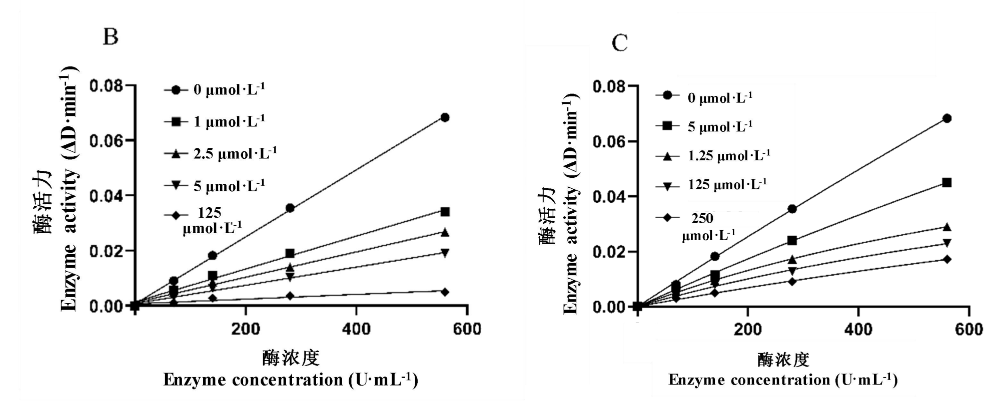
Fig. 3 Effects of *Panax japonicas* leaves saponin sites (A), 20(*R*)-Ginsenoside Rg$_2$ (B) and Ginsenoside Rb$_3$(C) and Orlista (D) on lipase activity.

3.3 不同皂苷对脂肪酶的抑制作用机理

按照“2.2.2”项下的测定方法，将反应液置于酶标仪中 37 ℃恒温，间隔 20 s 测定一次共测定 7.5 min，选取(0~7.5 min 吸光度随时间的改变拟合方程，其斜率)即为酶活力值。以相对酶活力对酶浓度作图，根据图像判断不同皂苷对脂肪酶活性的抑制作用是否可逆。如果作图结果为一组直线且通过原点，则为可逆抑制；如果得到一组平行直线，则为不可逆抑制。

图 4 为珠子参叶皂苷部位、20(*R*)-人参皂苷 Rg$_2$、人参皂苷 Rb$_3$ 的浓度、酶活力与酶浓度的关系。由图 4 可见，以酶活力对酶浓度作图时，得到一组通过原点的直线，该直线的斜率随着珠子参叶皂苷部位、20(*R*)-人参皂苷 Rg$_2$、人参皂苷 Rb$_3$ 浓度的增大而逐渐降低，表明珠子参叶皂苷部位、20(*R*)-人参皂苷 Rg$_2$、人参皂苷 Rb$_3$ 是通过抑制脂肪酶活力导致脂肪酶催化水解 4-NPP 的速度减慢，而不是通过降低有效酶量所导致的，说明珠子参叶皂苷部位、20(*R*)-人参皂苷 Rg$_2$、人参皂苷 Rb$_3$ 对脂肪酶活性的抑制属于可逆型抑制。





A. 珠子参叶皂苷部位；**B**. 20(*R*)-人参皂苷 Rg_2；**C**. 人参皂苷 Rb_3。

A. saponins fraction from *Panax japonicas* leaves; **B**. 20(*R*) -Ginsenoside Rg_2; **C**. Ginsenoside Rb_3.

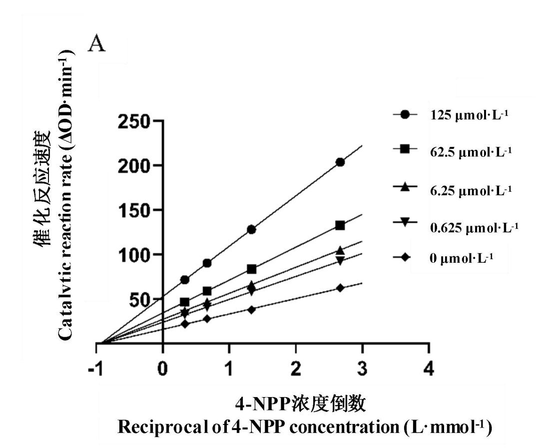
图 4 不同浓度样品下酶浓度与酶活力的关系

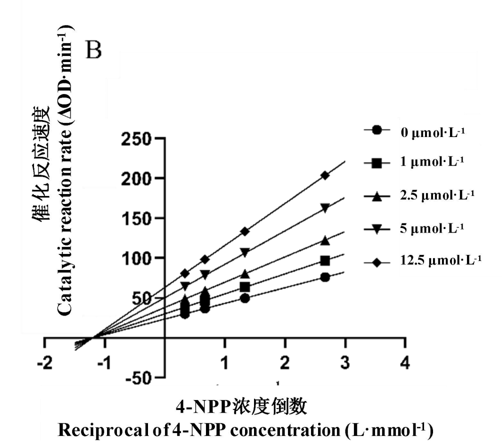
Fig. 4 The relationship between enzyme concentration and enzyme activity under different concentrations of samples

3.4 不同皂苷对脂肪酶活性的抑制类型和抑制常数

利用“2.2.3”项下的测定结果按照 $V=\triangle A_{405}/t$ 计算催化反应速度，以反应速度的倒数(1/*V*)对底物浓度的倒数(1/S)作图，判断珠子参叶皂苷部位、人参皂苷 Rb_3、20(*S*)-人参皂苷 Rg_2 对脂肪酶活性的抑制类型和抑制常数。

图 5、图 6 和图 7 为珠子参叶皂苷部位、20(*R*)-人参皂苷 Rg_2、人参皂苷 Rb_3 的抑制类型和抑制常数。由图 5 可见 Lineweaver-Burk 双倒数图，该 3 个样品图均为相交于横轴一点的线，随着样品浓度的增大，K_m 值不变，V_m 值逐渐减小，符合非竞争型抑制类型的特征。以 Lineweaver-Burk 曲线中的斜率对 3 个样品浓度做图，得到抑制剂的结合常数 K_I 分别为 0.27、2.53、0.17，见图 6；再以截距对浓度得到抑制常数 K_{IS} 分别为 21.46、28.00、3.80，见图 7，3 个样品的 *K*m 值分别为 1.07，0.83，8.64。





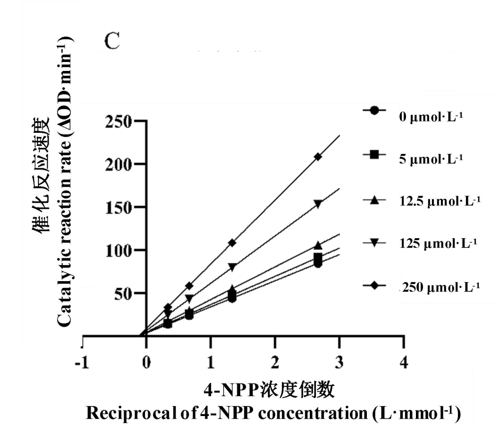
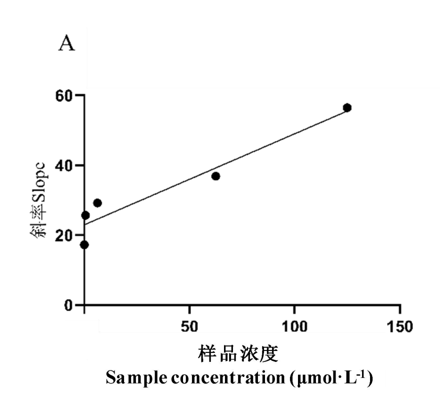
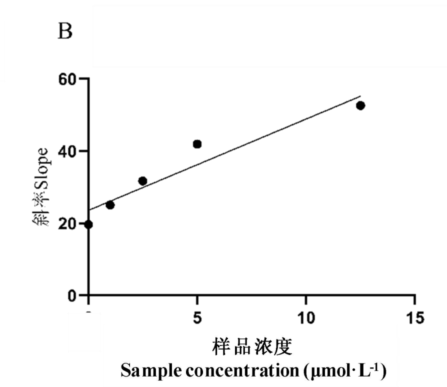


图 5 珠子参叶皂苷部位（A）、20(*R*)-人参皂苷 Rg$_2$（B）、人参皂苷 Rb$_3$（C）的抑制类型

Fig. 5 Inhibitory types of saponins fraction from *Panax japonicas* leaves (A), 20 (*R*)-Ginsenoside Rg$_2$(B)-and Ginsenoside Rb$_3$(C)





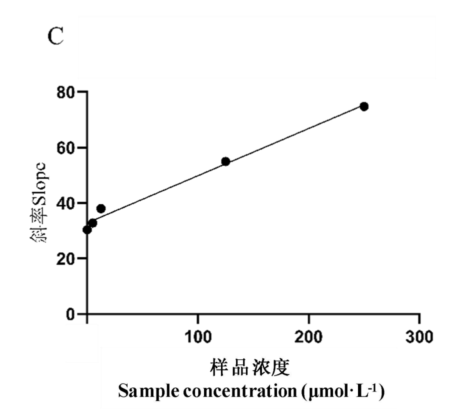
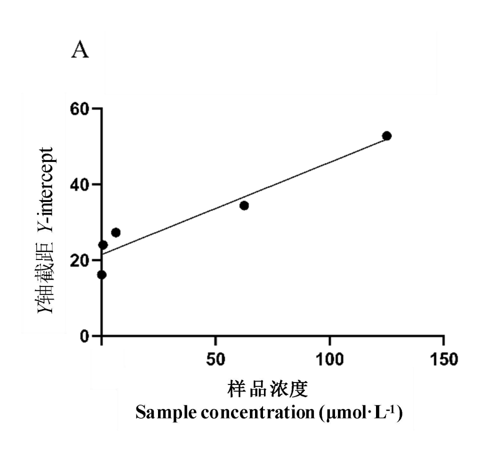
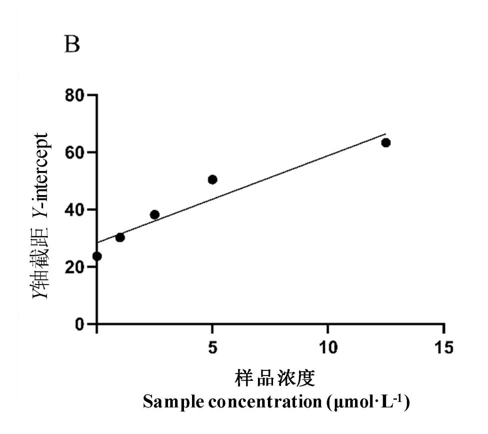


图 6 珠子参叶皂苷部位（A）、20(*R*)-人参皂苷 Rg_2（B）、人参皂苷 Rb_3（C）的抑制常数 K_I

Fig. 6 The inhibition constant K_I of saponins fraction from *Panax japonicas* leaves (**A**), 20(*R*)-Ginsenoside Rg_2(**B**) and Ginsenoside Rb_3(**C**)





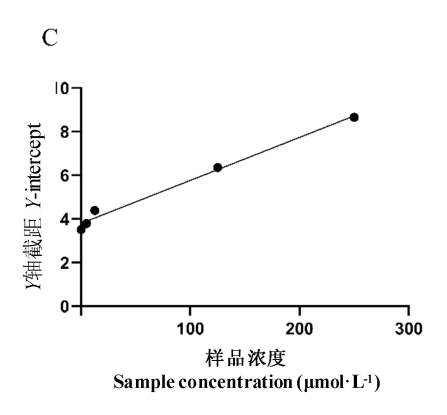
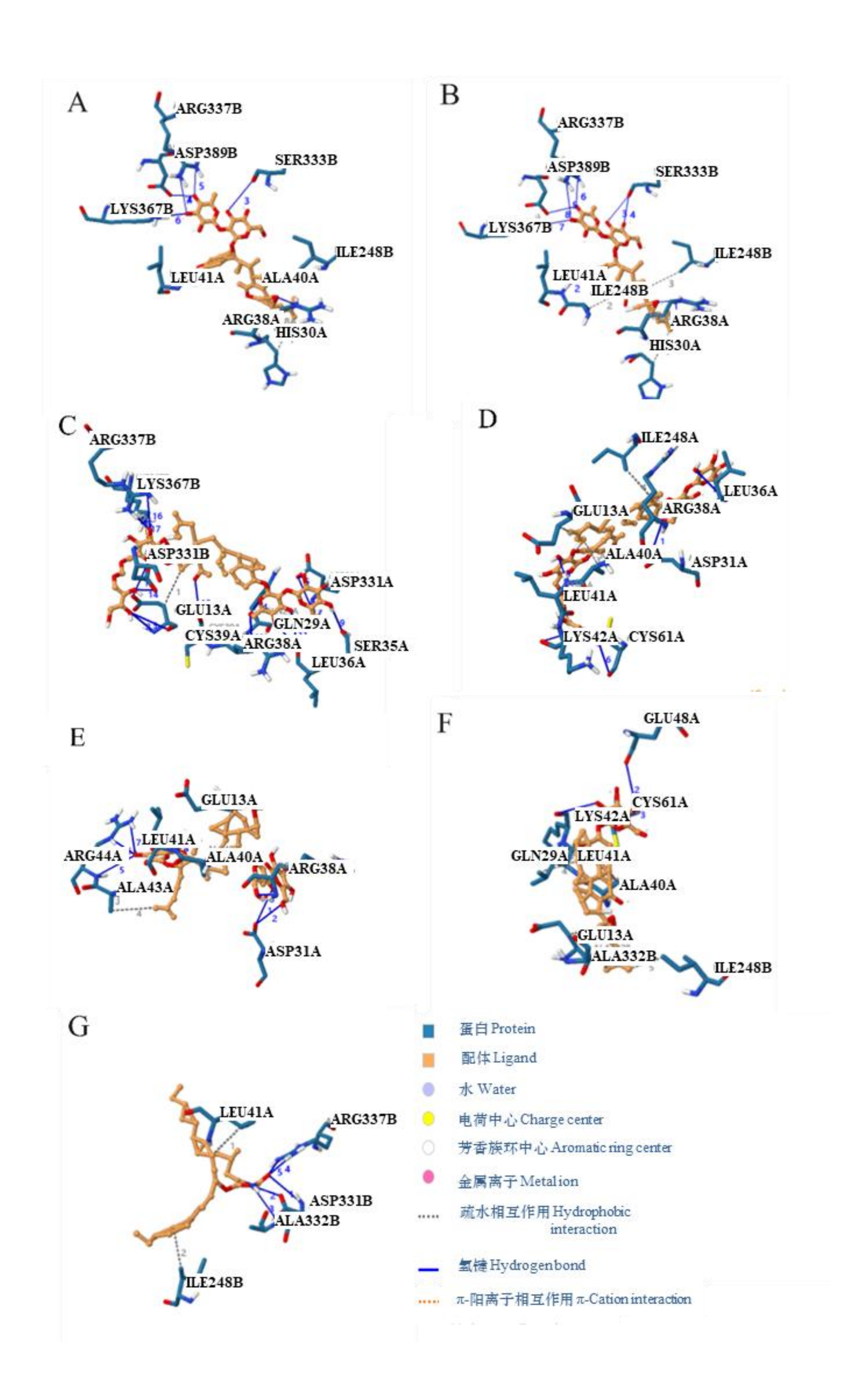


图 7 珠子参叶皂苷部位（A）、20(*R*)-人参皂苷 Rg_2（B）、人参皂苷 Rb_3（C）的抑制常数 K_{IS}

Fig. 7 Inhibitory constant K_{IS} of saponins fraction from *Panax japonicas* leaves (**A**), 20(*R*)-Ginsenoside Rg_2(**B**) and Ginsenoside Rb_3(**C**)

3.5 分子对接结果



A. 20(*S*)-人参皂苷 Rg$_{2}$; **B**. 20(*R*)-人参皂苷 Rg$_{2}$; **C**. 人参皂苷 Rb$_{2}$; **D**. 人参皂苷 Rb$_{3}$; **E**. 人参皂苷 Rd; **F.** 人参皂苷 Rh$_{2}$; G. 奥利司他。

A. 20(*S*)-Ginsenoside Rg$_{2}$; **B**. 20 (*R*)-Ginsenoside Rg$_{2}$; **C**. Ginsenoside Rb$_{2}$; **D**. Ginsenoside Rb$_{3}$; **E**. Ginsenoside Rd; **F**. Ginsenoside Rh$_{2}$; **G**. Orlistat.

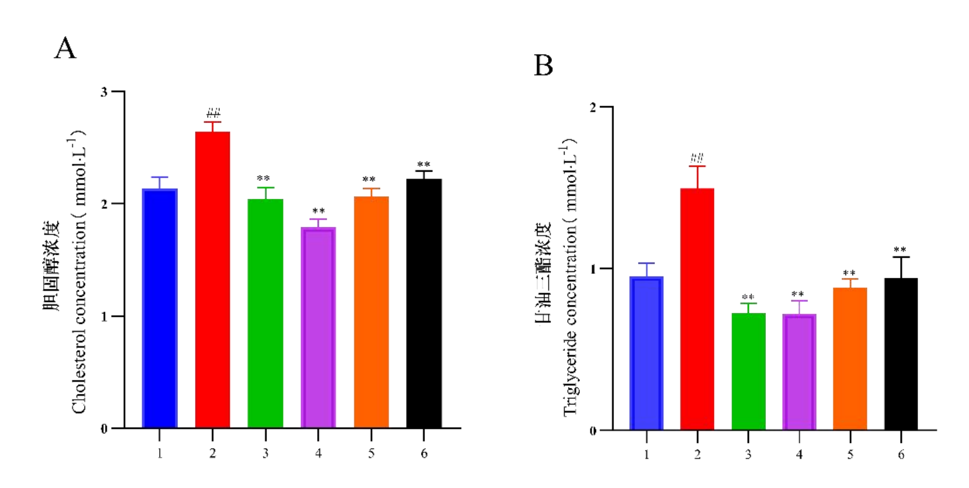
图 8 各皂苷单体和奥利司他与脂肪酶 ILPB 残基的相互作用三维图

Fig. 8 Three-dimensional maps of the interactions of each saponin monomer and orlistat with the acid residues of lipase ILPB

采用分子对接技术探讨配体与蛋白 ILPB 的相互作用。20(*R*)-人参皂苷 Rg_2 与 ILPB 的 ARG38A、LEU41A、ASP331B、SER333B、ARG337B、LYS367B 形成氢键结合，与 HIS30A、ALA40A、 ILE248B 等氨基酸残基形成疏水作用(见图 8A)；20(*S*)-人参皂苷 Rg_2 与 ILPB 的结合方式与 20(*R*)-人参皂苷 Rg_2 相似见图 8B，其不同之处在于 20(*S*)-人参皂苷 Rg_2 糖苷基 4 位和 5 位氢键同时与 SER333B 氨基酸残基连接；人参皂苷 Rb_2 与 ILPB 的结合方式见图 8C，人参皂苷 Rb_2 与 GLU13A、GLN29A、ASP31A、LEU36A、SER35A、ARG13A、CYS39A、ASP331B、ARG337B、LYS367B 形成氢键结合，与 GLU13A 残基形成疏水作用，人参皂苷 Rb_2 与 LYS367B 之间形成π-阳离子相互作用力，嵌入 ILPB 蛋白活性口袋中实现与 ILPB 的结合；人参皂苷 Rb_3 与 ILPB 的结合方式见图 8D，人参皂苷 Rb_3 与 ASP31A、LEU36A、LEU41A、LYS42A、CYS61A 形成氢键结合，GLU13A、ARG38A、ALA40A 等氨基酸残基形成疏水作用，嵌入 ILPB 蛋白活性口袋中实现与 ILPB 的结合；人参皂苷 Rd 与 ILPB 的结合方式见图 8E，人参皂苷 Rd 与 ASP31A、ARG38A、ALA40A、ALA43A、ARG44A 形成氢键结合，与 GLU13A、ALA40A、LEU41A、ALA43A 等氨基酸残基形成疏水作用，嵌入 ILPB 蛋白活性口袋中实现与 ILPB 的结合；人参皂苷 Rh_2 与 ILPB 的结合方式见图 8F，人参皂苷 Rh_2 与 GLN29A、LYS42A、GLU48A、CYS61A 形成氢键结合， 与 GLU13A、ALA40A、LEU41A、ILE248B、ALA332B 氨基酸残基形成疏水作用，嵌入 ILPB 蛋白活性口袋中实现与 ILPB 的结合；奥利司他与 ILPB 的结合方式见图 8G，奥利司他与 ARG337B、ALA332B、ASP331B 形成氢键结合, ILE248B 和 LEU41A 氨基酸残基形成疏水作用，嵌入 ILPB 蛋白活性口袋中实现与 ILPB 的结合。

3.6 胆固醇和甘油三脂测定结果

珠子参叶皂苷部位对小鼠血清 TC 和 TG 的影响如图 9 所示，高脂血模型组小鼠血清中 TG、TC 含量均明显高于空白组（P<0.01），说明高血脂模型造模成功；皂苷部位的低、中、高剂量组小鼠血清中的 TG、TC 含量均明显低于高脂血模型组（P<0.01），其中高剂量组降低 TG 作用与奥利司他组相当，降低 TC 作用优于奥利司他组。



1. 对照组；**2.** 模型组；**3.** 奥利司他组；**4.** 高剂量组；**5.** 中剂量组；**6.** 低剂量组。##与对照组比较 P<0.01，**与模型组比较 P<0.01。

1. Blank group **2.** Model group **3.** Orlistat group **4.** High dose group **5.** Middle dose group **6.** Low dose group. ## compare with blank group (P<0.01)，**compare with model group (P<0.01).

图 9 珠子参叶皂苷部位对小鼠血清 TC（A）和 TG（B）的影响

Fig.9 Effects of saponins fraction from *Panax japonicas* leaves on serum TC (A) and TG (B) in mice

4 讨论与结论

长期以来，由于对合理开发利用中药植物资源认识不足，导致对中药植物资源进行掠夺式过度采收，使得一些中药资源处于濒危状态。为了保护和合理开发珠子参资源，对珠子参整株植物进行系统化学研究和药用价值探索，以提高珠子参资源的利用率。珠子参地下部分为传统药用部位，其地上部分的药用价值有待开发，且在地下部分采收过程中地上部分大多被遗弃，药农仅保留少量在民间泡茶饮用，造成一定的资源浪费；另外珠子参为多年生草本植物，每年秋季种植基地和野生资源的珠子参地上部分自然枯萎腐烂，未被合理采收使用。前期研究发现珠子参叶主要成分为三萜皂苷类化合物，且三萜皂苷类化合物具有脂肪酶抑制作用，本实验采用 HPLC 确定珠子参叶皂苷部位的主要单体成分，测定其体内外脂肪酶抑制作用，为珠子参资源合理开发利用提供依据。

脂肪进入小肠后被胰脂肪酶水解，中链甘油三脂被水解为游离脂肪酸和甘油，中链脂肪酸与白蛋白结合，通过门静脉转移到肝脏；长链甘油三脂被水解为游离脂肪酸、单酰基甘油酯和甘油，长链脂肪酸在小肠中形成乳糜微粒，经淋巴管流入静脉系统被输送到脂肪组织和肌肉等外周组织，一部分被氧化，另一部分重新合成甘油三脂储存在组织。(Buhman et al., 2002; Takeuchi et al., 2002; Siddiqi, et al., 2006;姚晓琳，2018)。脂肪酶负责水解胃肠中 50%～70%膳食脂肪，是防治肥胖的一个关键靶点，而脂肪酶抑制剂可通过降低该酶的活性减少消化器官中膳食脂肪的分解和吸收，进而改善肥胖和高脂血症等代谢性疾病 (苗志国等，2009)。奥利司他是临床上常用的胰脂肪酶抑制剂，是美国 FDA 批准的唯一的脂肪酶抑制剂 (Kang et al., 2012)，能够抑制胰脂肪酶、胃肠道的羧基酯酶和磷脂酶 A_2 的活性，减慢胃肠道中食物脂肪的水解过程，从而减少饮食中 25%~30%的脂肪水解和吸收 (Zhi et al., 1999；Benet et al., 2011)，从而减少热量摄入、控制体重，进一步降低因肥胖带来的一系列健康问题，本研究选择奥利司他作为阳性药。皱褶假丝酵母脂肪酶和 4-NPP 常用于测定化合物的脂肪酶抑制活性(Doolittle&Ben-Zeev, 1999；侯成波，2016)，实验结果表明珠子参叶皂苷部位和 20（*R*）-人参皂苷 Rg_2 表现出良好的脂肪酶抑制作用，是潜在的脂肪酶抑制剂。

珠子参叶皂苷部位和 20(*R*)-人参皂苷 Rg_2 具有较强的脂肪酶抑制作用，另外人参皂苷 Rb_3 在珠子参叶皂苷部位峰面积最高，因此测定三个样品对脂肪酶的抑制机制。通过动力学分析，珠子参叶皂苷部位、20(*R*)-人参皂苷 Rg_2、人参皂苷 Rb_3 对脂肪酶均为可逆性非竞争性抑制，说明该化合物不仅与游离酶结合，而且与酶-底物复合物结合，为阐明其脂肪酶抑制机制提供依据。

分子对接技术是一种模拟生物大分子与配体小分子结合及计算结合强度的手段，通过分子对接的方式来筛选活性分子，从而评价配体小分子与受体的相互作用（欧海亚，2021；席佳越，2022）。分子对接结果显示：珠子参叶皂苷成分与 ARG337B、ASP331B、ILE248B 残基结合可能有助于提高配体的脂肪酶抑制活性。抑制脂肪酶的活性可有效减少脂质的消化吸收，从而降低血脂水平，动物实验发现珠子参叶皂苷部位能显著降低高血脂小鼠血清中的 TG 和 TC 含量，提示珠子参叶皂苷部位可能是通过抑制脂肪酶的活性来发挥降脂作用。

中药中常含有多种活性成分，而中药治疗疾病往往是多种活性成分相互协同作用的结果(王四旺，2008)。珠子参叶皂苷部位的脂肪酶抑制活性强于 6 个单体成分，这可能是珠子参叶皂苷部位多组分之间相互协同作用的结果，再者珠子参叶中含有高活性脂肪酶抑制作用的单体化合物可能尚未被发现。今后研究中将继续分离珠子参叶的化学成分，进一步阐明化学物质基础及生物活性。

参考文献

BENET LZ, BROCCATELLI F, OPREA TI, 2011. Bddcs applied to over 900 drugs[J]. AAPS J,

13(4): 519-547.
BUHMAN KK, SMITH SJ, STONE SJ, et al., 2002. DGAT1 is not essential for intestinal triacylglycerol absorption or chylomicron synthesis[J]. J Biol Chem, 277(28): 25474-25479.
CHEN J, WEI JT, PEI D, 2021. Study on the inhibitory effect of oleuropein on tyrosinase [J]. Nat Prod Res Dev, 33 (12) : 1998-2003. [陈静，魏鉴腾，裴栋等, 2021. 橄榄苦苷对酪氨酸酶抑制作用的研究[J]. 天然产物研究与开发, 33(12): 1998-2003.]
DE LA GARZA AL, MILAGRO FI, BOQUE N, et al., 2011. Natural inhibitors of pancreatic lipase as new players in obesity treatment[J]. Planta Med, 77(8): 773-785.
DOOLITTLE MH and BEN-ZEEV O, 1999. Immunodetection of lipoprotein lipase: antibody production, immunoprecipitation, and western blotting techniques [J]. Methods Mol Biol, 109:215-237.
ERCAN P and EL SN, 2016.Inhibitory effects of chickpea and Tribulus terrestris on lipase, α-amylase and α-glucosidase. Food Chem, 205:163-169.
FENG HY, 2019. Rapid identification, separation and identification of active components inhibiting lipase in Ilex cornuta leaves [D]. Shanghai : Shanghai University of Traditional Chinese Medicine. [冯海燕, 2019. 枸骨叶中抑制脂肪酶活性成分的快速识别与分离、鉴定[D]. 上海: 上海中医药大学.]
HAN LK, ZHENG Y-N, YOSHIKAWA M, et al., 2005. Anti-obesity effects of chikusetsusaponins isolated from Panax japonicus rhizomes[J]. BMC Complement Altern Med, 5(1): 9.
HE R, LIU Q, LIU YH, et al., 2014. Study on chemical constituents of P.japonicus leaves [J]. Chin J of Chin Mat Med, 2014,39 (9) : 1635-1638. [何瑞，刘琦，刘银环等. 2014. 珠子参叶化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 39(9):1635-1638.]
HOU CB, 2016. Evaluation of lipase inhibition and intestinal absorption in lotus leaves [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2016 : 38-59. [侯成波. 2016.荷叶脂肪酶抑制及肠吸收评价研究[D]. 北京：北京中医药大学, 2016:38-59.]
HUANG GL, WANG YN, MA JJ, et al., 2021. Inhibition of loquat flower polyphenols on lipase [J]. Jiangsu J Agr Sci, 37 (1) : 5. [黄桂丽，王毓宁，马佳佳等. 2021. 枇杷花多酚对脂肪酶的抑制作用[J]. 江苏农业学报, 37(1): 5.]
JAEGER KE and REETZ MT, 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology [J]. Tends Biotechnol, 16(9): 396-403.
JIANG HF, WANG YQ, LIU CG, 2007. Comparison and improvement of three lipase activity determination methods [J].Chem & Bioeng, 24 (8) : 4. [江慧芳,王雅琴,刘春国, 2007. 三种脂肪酶活力测定方法的比较及改进[J]. 化学与生物工程, 24(8): 4.]
KANG JG and PARK CY, 2012. Anti-obesity drugs:a review about their effects and safety[J]. Diabetes Metab J, 36(1):13-25.
LIU R, ZHENG Y, CAI Z, et al., 2017. Saponins and Flavonoids from Adzuki Bean (Vigna angularis L.) Ameliorate High-Fat Diet-Induced Obesity in ICR Mice. Front Pharmacol, 8:687.
LIU TT, HE XR, XU RX, et al., 2018. Inhibitory mechanism and molecular analysis of furoic acid and oxalic acid on lipase[J]. Int J Biol Macromol, 120: 1925-1934.
LIAO JL, FANG TL, FAN YL, 2022. Inhibitory effect of flavonoids from Lycium barbarum leaves on pancreatic lipase activity [J]. Chin Inst Food Sci Technol, 22 (5) : 43-53. [廖家乐,方甜,范艳丽.2022. 枸杞叶黄酮对胰脂肪酶活性的抑制作用[J]. 中国食品学报, 22(5):43-53.]
LU WC, 2016. Identification of Renseng leaf and Seng leaf [J]. ChinMedMat, 39 (1) : 213-215.

[陆维承. 2016. 人参叶和参叶考辨[J]. 中药材, 39(1):213-215.]
MIAO ZG, 2009. Study on the difference of fat metabolism and digestive function between Jinhua and Landrace [D].Hangzhou: Zhejiang University, 2009 : 100-116. [苗志国. 2009. 金华猪与长白猪脂肪代谢和消化功能发育差异的研究[D]. 杭州：浙江大学，2009：100-116.]
National Pharmacopoeia Committee, 2020. Chinese Pharmacopoeia [S]. Beijing : China Pharmaceutical Science and Technology Press, 2020 : 283-284. [国家药典委员会.2020.中华人民共和国药典[S].一部.北京:中国医药科技出版社，2020：283-284.]
NAVARRO DEL HIERRO J, CASADO-HIDALGO G, REGLERO G, et al., 2020. The hydrolysis of saponin-rich extracts from fenugreek and quinoa improves their pancreatic lipase inhibitory activity and hypocholesterolemic effect. Food Chem, 338:128113.
OU HY, YE XP, JI YC, et al., 2021.Based on molecular docking technology to explore the potential material basis and medication rule of traditional Chinese medicine inhibiting human pancreatic lipase activity [J].Mod of Trad Chin Med Mat Med-World Sci Tech, 23 (11) : 4211-4221. [欧海亚,叶小鹏,纪意纯等. 2021.基于分子对接技术探讨中药抑制人胰脂肪酶活性的潜在物质基础以及用药规律研究[J].世界科学技术-中医药现代化, 23(11): 4211-4221.]
QIU Y, 2020. Extraction, purification and physiological activity of total saponins from Xanthoceras sorbifolia leaves [D].Changchun: Jilin Agricultural University. [邱悦. 2020.文冠果叶总皂苷的提取纯化及其生理活性研究[D].长春: 吉林农业大学.]
SIDDIQI SA, MAHAN J, SIDDIQI S, et al., 2006. Vesicle-associated membrane protein 7 is expressed in intestinal ER. J Cell Sci, 119(Pt 5):943-50.
SONG XM, 2011. Research and application of Taibai Qiyao [M]. Beijing: Peoples’ medical publishing house Co., LDT, 101-111. [宋小妹. 2011. 太白七药研究与应用[M]. 北京：人民卫生出版社出版, 101-111.]
TAKEUCHI H, KASAI M, TAGUCHI N, et al., 2002. Effect of triacylglycerols containing medium- and long-chain fatty acids on serum triacylglycerol levels and body fat in college athletes. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 48(2):109-114.
WANG YF, ZHANG ZX, HE RJ , et al., 2020. [J]. Study on the chemical constituents and pancreatic lipase inhibitory activity of the aerial parts of Polygonatum sibiricum [J]. Nat Prod Res Dev, 32 (11) : 1811-1817. [王亚凤, 张祖湘, 何瑞杰等. 2020. 黄精地上部位化学成分及其胰脂肪酶抑制活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 32(11): 1811-1817.]
WANG SW, 2008. ' Molecular Chinese Materia Medica ' connotation and modern Chinese medicine [J].Asia-Pacific Trad Med, 4 (3) : 9-12. [王四旺. 2008. “分子中药学”内涵与现代中医药[J].亚太传统医药, 4(3):9-12.]
WANG Z, WANG P, HUANG J, 2013. Application progress of molecular simulation technology in the study of lipase properties and catalytic mechanism [J]. Chem Ind Eng, 32 (10) : 6. [王哲,王普,黄金. 2013. 分子模拟技术在脂肪酶性质及催化机理研究中的应用进展[J]. 化工进展，32(10): 6.]
XI JY, ZHANG DX, NIE HF et al., 2022. Teaching practice of molecular docking technology in pharmaceutical chemistry experiment [J]. Res Exp Lab, 41 (3) : 231-234. [席佳越,张东旭,聂慧芳等. 2022.分子对接技术在药物化学实验中的教学实践[J].实验室研究与探索, 41(3):231-234.]
XU H, JIANG Y, XU HY, et al., 2007. Study on the extraction technology of total saponins from the leaves of Hanzhong Ginseng [J].Mod Chin Med, 27 (3) : 78-79. [徐虹, 姜祎, 许海燕等. 2007. 汉中参叶总皂苷提取工艺研究[J]. 现代中医药, 27(3):78-79.]

YAO XL, NIE K, CHEN Y, et al., 2018. Effect of composite interface on fat digestion in food emulsion [J].Food Sci, 39 (2) : 1-7. [姚晓琳,聂珂,陈玉等. 2018.复合界面对食品乳液中脂肪消化的影响[J].食品科学, 39(2):1-7.]

YANG Y, ZHANG X, JIANG S, et al., 2019. Research progress on saponins and their pharmacological activities in Panacis Majoris Rhizoma [J]. Sci Tech Food Ind, 40 (2) : 347-356.[杨延, 张翔, 姜森等. 2019. 珠子参中皂苷成分及其药理活性研究进展[J]. 食品工业科技, 40(2): 347-356.]

YOSHIZUMI K, HIRANO K, ANDO H, et al., 2006. Lupane-type saponins from leaves of acanthopanax sessiliflorus and their inhibitory activity on pancreatic lipase[J]. J Agric Food Chem, 54(2): 335-341.

YUN JW, 2010. Possible anti-obesity therapeutics from nature-a review[J]. Phytochemistry, 71(14-15): 1625-1641.

ZHANG HW, JIANG Y, HUANG WL, et al., 2020. A new triterpenoid saponin [J]. Chin Trad Herb Drugs, 51 (1) : 26-30. [张化为,姜祎,黄文丽等, 2020.珠子参叶中 1 个新的三萜皂苷[J].中草药,51(1):26-30.]

ZHAO DD, SONG XM, TANG HF, et al., 2013. Study on saponins from the leaves of Panacis Majoris Rhizoma [J]. Cent South Pharm , 11 (2) : 85-88. [赵东东,宋小妹,汤海峰等. 2013.珠子参叶的皂苷成分研究[J]. 中南药学, 11(2):85-88.]

ZHAO XM, 1963. Compendium of materia medica [M]. Beijing: Peoples' medical publishing house Co., LDT, 61. [赵学敏. 1963. 本草纲目拾遗[M]. 北京：人民卫生出版社，61.]

ZHI J, MULLIGAN TE, HAUPTMAN JB, 1999. Long-term systemic exposure of orlistat, a lipase inhibitor, and its metabolites in obese patients[J]. J Clin Pharmacol,39(1): 41-46.